

AD 626393

TRANSLATION NO. 63

DATE: Sept 1968

DDC AVAILABILITY NOTICE

This document has been approved for public release and sale; its distribution is unlimited.

Sept 1968

Unlimited

DEPARTMENT OF THE ARMY
Fort Detrick
Frederick, Maryland

Reproduced by the
CLEARINGHOUSE
for Federal Scientific & Technical
Information Springfield Va 22151

#63

dy 1

Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology USSR, No. 3, 1956, Pages 73-79

A test of specific serums for an extraordinary prophylactic for brucellosis, by
M. S. Drozhevskina and T. I. Maritonova

Many cattle-breeders are confronted with this situation when they care for their cattle and sheep during lambing and shearing; they find animals who have not responded to the vaccination or who have been missed completely. An urgent prophylactic is needed to solve this as well as to combat new centers of infection.

The development of a brucellosis prophylactic could be fulfilled by the creation of a passive immunity or various preparations, partially, antibiotics.

The most studied method of the above is the passive immunization, derived through the introduction of specific serums to personnel, who react with infectious material.

Soviet studies of the past few years have proved the possibility of protection against this infection with anti-brucellosis serums or with preventative properties of anti-brucellosis serum.

The majority of known anti-brucellosis serums were obtained as a result of immunization and hyperimmunization of animals with killed vaccines and with various specific and non-specific antigens. Only three studies used an additional immunization with live cultures of brucellosis.

The most effective medical and prophylactic properties are possessed by serums obtained through immunization of animals with full-value antigens, selected from strains and prepared by the best method.

Hoping to clarify the influence of the antigens on the quality of the serum, we used various strains, in regard to antigens; Br. melitensis 512

and 513 in V form, possessing Vi antigens, and W form of these strains, Br. melitensis 363-typical, representing W-form, deprived of Vi antigen, and vaccine strain Br. abortus BA (intermediate V W).

Attaching importance to the method of obtaining serum, we tested antigens, prepared by various methods; 1. killed by heating, 2. spirit with an alcohol preservative, 3. obtained by the principle used in preparing AD vaccine, 4. irradiated by rays of quartz, 5. live.

We immunized rabbits via a three-fold intravenous injection of these antigens. Intervals between injections were 5 days. For immunization with live cultures we injected 250 million microbe cells for the first injection, 500 million for the second and 2 million for the third. With killed antigens the doses were larger; 500 million, 2 million and 3 million. Blood for serum was taken 14-15 days after the last injection.

The serums obtained were studied for the presence of O- and Vi agglutinins, and the activation of phagocytic activeness of the leukocytes of the blood of rabbits by them and bactericidality.

As a control in all tests we run respective tests with medicinal anti-brucellosis serums, serums (both Uvaroba's) and with anti-brucellosis serums obtained from Odessa, and also serum of healthy rabbits.

As Table 1 shows, all the serums, obtained after immunization of the rabbits with typical strains; Br. melitensis 363 and others of W form, independent of the method of preparing the antigens, only O agglutinins, held a high titer (1:2560). Immunization of the rabbits with antigens, possessing a quantity of Vi antigens, caused the presence of both O and Vi agglutinins in the serum, with the most Vi agglutinins derived with live serum. They were present in

small quantities in serum of animals, immunized with spirit and AD antigens, and were completely absent in serum of rabbits, immunized with brucella, killed by heating. The greatest show of Vi agglutinins was in serum obtained after immunization with a V form. There was less of a show after immunization with the intermediate strain Br. abortus BA.

Two series of serum used for control held a high titer of O agglutinins, but Vi agglutinins were completely absent. The serum from Odessa held a small titer of Vi agglutinins along with the O (1:160).

Evidently the quantity of specific agglutinins, and their composition depended on the quality of antigens applied in these tests.

Our study of the ability of the serums to increase the phagocytic activeness of the leukocytes showed the Vi serums to effect the phagocytes more.

The ability to activate the phagocytes was possessed by serums obtained from rabbits, immunized with live culture of brucellosis. The activeness of serums of rabbits, immunized with spirit vaccines, was twice as weak; and there was no show of activeness at all in serum obtained from rabbits, immunized with brucella, killed by heating. The serums possessing the greatest ability to activate the phagocytes were serums obtained through immunization of rabbits with live brucella strains 512V and 513V (10.05 and 4.14). The ability of these serums was less when they were used in a W form.

Bactericidal properties of these serums were studied by the method of Arzhelas and Kuntsman; strains were Br. melitensis 363 (W), 504 (V) and 535 (VW).

Table 3 shows that the bactericidal properties of these serums also depended on the quality of antigen used to immunize the animals. Vi serums possessed the best bactericidal properties, and namely Br. melitensis 513V.

The serum from Odessa and one other were very weak in this respect. No

bactericidal properties were found in serum of healthy rabbits.

We studied the preventative properties of serums on white mice and guinea pigs, during simultaneous and separate injections of serum and brucellosis.

Several series of tests were run on the white mice. The mice were injected with 1000 microbe cells, subcutaneously, of a virulent strain Br. melitensis 535, which for guinea pigs was only 2 microbe bodies. Tested were single intraperitoneal and intramuscular introductions of 0.3 milliliters of serum and three-fold intraperitoneal introductions in doses of 0.3, 0.2 and 0.2 milliliters.

The degree of distribution of brucella in the mice was an indicator of the preventative action.

All the animals, tested and control, were dissected 20 days after infection. The lymphatic nodes, spleen, liver, lungs, blood, urine and bone marrow were subjected to biological analysis.

The results of the test are on Table 4, where it is shown that the introduction of the serums controlled the distribution of the brucella in the organism of white mice. The amount of control of live cultures was more than the control of heated and spirit serums, the best being a Vi serum Br. melitensis 512V (0.04). Identical results were obtained during single intramuscular introductions of serum. Better results were obtained with a three-fold introduction of serum. A weak preventative action was shown by serum obtained through immunization with AD vaccines and with vaccines killed by irradiation. Weak results were obtained also with serum of rabbits immunized with typical strains of Br. melitensis 363. The Uvarova strains and the strain from Odessa proved to be void of the ability to control the distribution of the brucella in the organism of the infected mice.

In this test the good protective properties of the Vi serums were disclosed.

A three-fold introduction of these serums (512V and 513V) protected all the mice in the test from infection; biological analysis later proved them completely sterile.

A study of the dynamics of distribution of the brucella in the organism of mice infected with 1000 microbe cells of Br. melitensis and a three-fold introduction of Vi serum showed that the serum localized the brucella in the lymphatic nodes and later brought about its death. In control animals there developed a generalized infection (brucella in all the lymphatic nodes, spleen and liver).

In another test we compared the preventative properties of various serums. Again the Vi serums proved better; brucella was found only in the regional nodes, while with other serums, the brucella was found in all the lymphatic nodes and in the urine. Multiple injections of Br. melitensis 599 were used for infecting.

Analogical results were obtained on guinea pigs.

CONCLUSIONS

1. Specific Vi serums can be used for extraordinary prophylactics and possibly for therapy of brucellosis.

2. Vi serums during tests in vitro acted as bactericides, activated the phagocytic activity of the leukocytes and contained a full selection of antibodies. They proved to be high preventative measures in animals.

3. Multiple introductions of Vi serum contributed to the localization of the brucella in levels of the first complex and caused the later sterilization of the white mice infected.

4. There is required a more accurate selection of strains and a calculation of their antigenic structure and better methods of preparing antigens. Thus Vi serum may mean a future prophylactic and medicinal serum.

W-форму, лицензированную Vi-антителами, и вакцинированный штамм Br. abortus BA (промежуточный — VW).

Придавая большое значение методике получения сыворотки, мы испытывали антигены, приготовленные различными методами: 1) убитым нагреванием, 2) спиртовой с алкогольным консервантом, 3) полученные по принципу изготовления АД-вакции, 4) облученным лучами кварца и 5) живой.

Иммунизацию кроликов мы производили путем троекратного инъекционного введения им этих антигенов. Интервалы между инъекциями равнялись 5 дням. При иммунизации живыми культурами бруцеллы при первой инъекции вводилось 250 млн., при второй — 500 млн. и при третьей — 2 млрд. микробных клеток. При иммунизации убитыми анти-

Таблица 1
Агглютинационные (O и Vi) титры сывороток кроликов, иммунизированных различными антигенами бруцеллы

	Antigen used for immunization					
	Strain used	agglut in	live cul	heat cul	spirt A D	irrad ated
363	O	1:2560	1:1280	1:2560	1:2560	1:2560
	Vi	—	—	—	—	—
BA	O	1:1280	1:1280	1:2560	1:2560	1:2560
	Vi	1:320	—	—	—	—
512 V	O	1:320	—	1:40	1:80	—
	Vi	1:2560	—	—	1:640	1:640
512 W	O	1:2560	1:1280	1:2560	1:2560	1:2560
	Vi	—	—	—	—	—
513 V	O	1:80	1:1280	1:1280	—	—
	Vi	1:2560	—	—	—	—
513 W	O	1:2560	1:640	1:2560	1:2560	—
	Vi	—	—	—	1:40	—
Uvarova	O		1:2560			
	Vi		—			
Rostovskaya	O		1:2560			
	Vi		—			
Uvarova	O		1:2560			
	Vi		—			
Одесса	O		1:2560			
	Vi		1:160			

гемагглютинин дозировки были значительно выше — 500 млн., 2 млрд. и 3 млрд. микробных клеток. Взятие крови для получения сыворотки производили через 14—15 дней после последней инъекции.

Полученные сыворотки изучали на наличие в них О- и Vi-агглютининов, активацию ими фагоцитарной активности лейкоцитов крови здоровых кроликов и бактерицидность.

Во всех опытах в качестве контроля проводились соответствующие испытания лечебной антибрюцеллезной сыворотки Уварова (серия № 5 Ростовского института), сыворотки Уварова и противобруцеллезной сыворотки (бараньей), полученных из Одесского института вакцин и сывороток, а также сыворотки здорового кролика.

Как видно из данных табл. 1, все сыворотки, полученные после иммунизации кроликов «типичным» штаммом Br. melitensis 363 и другими штаммами бруцелл в V-форме, независимо от метода приготовления антигена содержали в высоком титре ($1:2560$) только О-агглютинины. При иммунизации же кроликов антигенами, обладавшими тем или иным количеством Vi-антитела, в сыворотке были как О-, так и Vi-агглютинины, причем больше всего последних содержалось в сыворотках, полученных путем иммунизации кроликов живой культурой бруцеллы. В незначительном титре они имелись в сыворотках животных, иммунизированных спиртовыми и АД-антителами, и полностью отсутствовали в сыворотках кроликов, иммунизированных бруцеллами, убитыми нагреванием. Наиболее богатыми Vi-агглютининами были сыворотки, полученные при иммунизации животных бруцеллами в V-форме. В сыворотке, полученной путем иммунизации кроликов промежуточным (заключенным) штаммом Br. abortus BA, их было значительно меньше.

Использованные в качестве контрольных для серий сыворотки Уварова содержали в высоком титре О-агглютинины при полном отсутствии в них Vi-агглютининов. Баранья антибрюцеллезная лечебная сыворотка Одесского института вакцин и сывороток, наряду с О-агглютининами, содержала в небольшом титре ($1:160$) Vi-агглютинины.

Таблица 2
Влияние сывороток на фагоцитарную активность лейкоцитов

		Антитела, использованные для иммунизации кроликов					
		Antigen	live	spirit	heat	AD	irradiated
Сыворотка			ed	ed	ed	ed	ed
Serum							
obtained	Br. melitensis 363		0,71	0,53	0	3,21	2,7
during im-	Br. abortus BA		0	0,81	0	3,5	X
muni-zation	Br. melitensis 512		10	2,26	0	2,03	1,9
of rabbits	> 512W		1,15	1,05	0	3,25	3,08
	> 513V		4,14	1,03	0	X	X
	> 513W		1,16	1,05	0	X	X
— — — сыворотка							
Kostotskaya			1,04				
Control Odessa			0,46				
Lam			0,33				

Таблица 3

Бактерицидные свойства сывороток

Strains used to immunized rabbits	Sub-strains	live spirit heated AD irradiated				
		363(W)	-	+	+++	++++
Br. melitensis	504(V)	+++	++++	++++	++++	++
	535(VW)	+	+	++	++++	++
Br. abortus BA	363	++	+	++++	++	+++
	504	+++	+++	++++	++++	++++
	535	++	++	++++	+++	+++
Br. melitensis 512 V	363	-		++	++	++++
	504	-		++	++	++
	535	-		++	++++	+++
Br. melitensis 512 W	363	++++	+	-	++	++
	504	++++	+++	++++	++++	++++
	535	-	+	+	++++	++++
Br. melitensis 513 V	363	+	++++	+		
	504	-	++	++		
	535	-	++	+		
Br. melitensis 513 W	363	-		++	++	
	504	+++		++++	++	
	535	±		++	+++	

		Сыворотка Serum				
		Чистка Уверена		Ratn Ante баранья противобру- целиальная	Лягушка нормальная красная	
		Ростовская	Одесская		Amphibia	
Контроль <i>Control</i>		+++	+	++	++++	
	363	+++	+	++	++++	
	504	+++	+	++	++++	
	535	++	+	+	+++	

Условные обозначения: — отсутствие роста; ±, +, ++,
+++ различная степень задержки роста; ++++ обильный рост (как
в контроле).

Таблица 1

Коэффициент выживаемости бруцелл от мышей, получивших внутримышечно сыворотку и зараженных Br. melitensis 535

Введение сыворотки	Антитела, использованные для иммунизации	Сыворотка									
		Опыт					Контроль				
		Br. melitensis		Vi		W	Br. melitensis		Uварова		Свинья
		363	512 V	512 W	513 V	513 W	Br. melitensis	Uварова	Ростовская	Одесская	Свинья
Однократное	Br. melitensis 363	0,24	0,10	0,16	0,32	0,32	0,12				
однократное	Сывороткой	0,29	0,25	0,12	0,2	0,33	0,2				
однократное	Живой	0,2	0,04	0,16	0,2	0,37	0,16	0,16			
однократное	Грудной	0,16	0,16	0,04	0,16	0,12	0,16				
однократное	Сывороткой	0,2	—	0,08	0,04	—	0,16				
однократное	Живой	0,27	0	0,08	0	0,08	0,12	0,08	0,33	0,54	0,23
однократное	АД-вакцина	0,29	0,25	0,29	—	0,37	0,2				
однократное	Убитый облучением	0,27	0,2	0,42	—	0,12					
однократное	Баранья	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

енты выживаемости бруцелл). Слабое превентивное действие оказали сыворотки, полученные путем иммунизации кроликов АД-вакцинами и вакцинами, убитыми облучением. Слабое защитное действие оказывают также сыворотка кролика, иммунизированного типичным штаммом Br. melitensis 363. Обе сыворотки Одесского института вакцин и сывороток (сыворотка Уварова и баранья) в этом опыте не обнаружили способности задерживать распространение бруцелл в организме зараженных мышей.

В этом опыте отчетливо выявились хорошие защитные свойства Vi-сывороток. Троекратное введение этих сывороток (512 V и 513 V) предохранило от заражения всех бывших в опытах белых мышей: в бактериологическом исследовании, произведенном через 20 дней после заражения, обнаружена полная их стерильность.

Изучение динамики распространения бруцелл в организме мышей при заражении их 1000 микробных клеток Br. melitensis 535 и троекратном введении Vi-сыворотки показало, что сыворотка способствовала кализации бруцелл в прелепах лимфатических узлов и последующей гибели. У контрольных животных в это же время беспрепятственно развивалась генерализованная инфекция (брюцеллы обнаруживались во всех лимфатических узлах, селезенке и печени).

В другом опыте мы сравнили превентивные свойства различных сывороток. Исследование на 20-й день после заражения Br. melitensis 535 мышей, получивших внутримышечно (микрогрануло) сыворотки V и W, показало, что, как и во всех предыдущих опытах, лучшей оказалась Vi-сыворотка, при введении которой брюцеллы были обнаружены только в регионарном узле, тогда как у мышей, получавших W-сыворотку, брюцеллы обнаруживались во всех лимфатических узлах и в моче.

В опытах на морских свинках были получены аналогичные результаты.